

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 800 299**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **99 13540**

⑤① Int Cl⁷ : B 01 J 20/24, B 01 D 39/14, 53/72, A 24 D 3/14, 1/04,
A 24 F 1/02 // C 07 H 21/00B 01 D 113:00, 157:00

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 28.10.99.

③⑩ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 04.05.01 Bulletin 01/18.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑩ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *GENSET Société anonyme* — FR.

⑦② Inventeur(s) : THARAUD CECILE et VASSEUR
MARC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ **PROCEDE POUR REDUIRE DANS UN FLUIDE LA CONCENTRATION EN MOLECULES SUSCEPTIBLES DE
REAGIR AVEC UN ACIDE NUCLEIQUE, FILTRE ET ARTICLE A FUMER UTILISANT LE PROCEDE.**

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé pour ré-
duire, dans un fluide, tel un gaz ou une fumée, destiné à être
mis en présence avec une structure biologique telle une cel-
lule humaine, la concentration en molécules mutagènes ou
cancérigènes susceptibles de réagir avec un acide nucléi-
que de ladite structure biologique, en mettant en contact
préalablement à la mise en présence dudit fluide avec ladite
structure, ledit fluide avec une quantité suffisante d'acide
nucléique. Plus particulièrement, cette invention concerne
un filtre comprenant une préparation contenant un acide nu-
cléique mettant en oeuvre ledit procédé, ainsi qu'un article
à fumer contenant ledit filtre tel une cigarette, un cigare ou
une pipe.

FR 2 800 299 - A1



La présente invention concerne un procédé pour réduire, dans un fluide, tel un gaz ou une fumée, destiné à être mis en présence avec une structure biologique telle une cellule humaine, la concentration en molécules mutagènes ou cancérigènes susceptibles de réagir avec un acide nucléique de ladite structure biologique, en mettant en contact
5 préalablement à la mise en présence dudit fluide avec ladite structure, ledit fluide avec une quantité suffisante d'acide nucléique. Plus particulièrement, cette invention concerne un filtre comprenant une préparation contenant un acide nucléique mettant en œuvre ledit
10 procédé, ainsi qu'un article à fumer contenant ledit filtre tel une cigarette, un cigare ou une pipe.

Le tabagisme est largement répandu à travers le monde depuis de nombreuses années. Seulement récemment il a été démontré que la fumée de tabac est dangereuse pour la santé non seulement des
15 fumeurs mais également des non-fumeurs victimes du tabagisme passif. En 1994, le tabagisme était responsable de 85 à 90% des cas de cancers du poumon en France, ce qui correspond, pour la seule année 1994, à une valeur moyenne de 20 000 décès provoqués par cancers du poumon dus au tabagisme.

20 Depuis quelques années, des efforts considérables sont déployés pour réduire les effets nuisibles de la fumée de tabac sur la santé. De nombreux rapports ont mis en évidence la nocivité de la fumée de tabac et en particulier des cigarettes. Il a été possible d'identifier l'effet mutagène et cancérigène de certains composés chimiques contenus
25 dans la fumée de tabac. La plupart de ces composés cancérigènes, identifiés dans les goudrons de la fumée de cigarettes qui résultent de la condensation de la fumée de tabac et de la plupart des constituants aisément condensables de la phase gazeuse, ne sont pas présents dans les fendilles de tabac originelles mais sont formés par pyrolyse à la
30 température élevée de combustion du tabac. En effet, au moment où l'air est aspiré à travers la cigarette, la température de la zone de combustion atteint approximativement 884°C et lorsque la cigarette

brûle sans être traversée par l'air, la température est d'environ 835°C. A de telles températures, il se produit des réactions pyrolytiques intenses dans le tabac, qui sont la cause de la formation de substances mutagènes et cancérigènes dans la fumée produite.

5 Ces composés toxiques contenus dans la fumée de tabac exercent leur action nocive au niveau de l'ADN (pour revue, voir Hecht S.S., 1999). Izzoti *et al.* (1999) ont ainsi récemment démontré la formation d'adduits d'ADN et la persistance d'altération de nucléotides dans l'ADN de rats placés dans un environnement enfumé par la fumée de
10 cigarette.

Au moins sept hydrocarbures polycycliques cancérigènes ont pu être identifiés dans la fumée de tabac, et parmi les composés fortement cancérigènes de ce type, il convient de citer les benzo(a)-pyrène, le dibenzo (a, i)-pyrène et le dibenzo(a, h)-anthracène. La liaison de ces
15 hydrocarbures polycycliques à l'ADN semblent être une condition préalable à l'initiation de leur bioactivité (pour revue, voir Welch *et al.*, 1977 ; Shoyab, 1979).

Parmi les autres composés toxiques contenus dans la fumée de cigarette, il convient de citer les radicaux libres. Il a été démontré
20 récemment que les radicaux libres contenus dans le goudron s'associent à l'ADN et y provoquent des dommages vraisemblablement responsables de la toxicité liée au tabagisme (Pryor *et al.*, 1998 ; Stone *et al.*, 1994). Le monoxyde d'azote (NO) est le radical libre le plus important dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette ; au cours de
25 la combustion du tabac, NO participe à différentes réactions qui conduisent à la formation de dioxyde d'azote, des radicaux isoprène, des radicaux peroxy et alcoxy. Il a ainsi été démontré que le peroxyde d'hydrogène induit des dommages oxydatifs dans l'ADN de cellules épithéliales pulmonaires de type II de rat (Meehan *et al.*, 1999).

30 La fumée de cigarette contient également de l'acide hydrocyanique, des aldéhydes aliphatiques saturés et insaturés telles l'acroléine, le formaldéhyde et l'acétaldéhyde qui contribuent aux effets

toxiques dramatiques de la fumée de cigarette. Il a ainsi été démontré que la formaldéhyde induit des cancers nasaux chez le rat, l'acétaldéhyde a des effets toxiques sur le myocarde, et l'acroléine est susceptible d'induire le cancer du foie.

5 La fumée de tabac contient également des N-nitrosamines telles la N-nitrosornicotine (NNN), la 4-(méthylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) et la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) qui sont de puissants carcinogènes. Ainsi, le NNN induit des tumeurs du poumon chez la souris, des tumeurs de la trachée chez le
10 hamster, et des tumeurs de l'œsophage et de la cavité nasale chez le rat. NNK induit des tumeurs du poumon chez la souris, le hamster et le rat, mais également des tumeurs du foie, de la cavité nasale et du pancréas chez le rat. L'action des nitrosamines spécifiques du tabac se fait via la formation d'adduit avec l'ADN (Hecht S.S., 1999).

15 Des types de pyrolyse comparables à celles produites dans le tabac existent également dans certains procédés industriels et sont responsables de la contamination de l'air par des substances cancérigènes ; il convient de citer de manière non exhaustive les procédés de distillation destructrice du charbon et du bois, de fumage
20 de denrées alimentaires, comme les viandes et les poissons, la combustion du fuel dans les moteurs-diesel ou à essence, l'incinération des ordures.

Le procédé de l'invention s'applique donc non seulement au traitement de la fumée de tabac mais également au traitement de tous
25 gaz contenant des composés mutagènes et cancérigènes ayant une affinité pour l'ADN. A ce titre, l'amiante constitue un composé mutagène et cancérigène ayant une affinité pour l'ADN.

Le procédé de l'invention sera décrit plus particulièrement, pour ce qui concerne la fumée de tabac des cigarettes.

30 Les cigarettes ont en général une structure en forme de bâton cylindrique et sont composées d'une portion de matériel à fumer tel que par exemple des morceaux de tabac entourés d'au moins un papier

formant ainsi une structure appelée « bâton de tabac ». En général, les cigarettes ont un élément filtre cylindrique aligné bout-à-bout avec le bâton de tabac et attaché à celui-ci. Les cigarettes sont utilisées par le fumeur en allumant une extrémité et en brûlant le bâton de tabac. Le fumeur reçoit l'essentiel de la fumée dans sa bouche en aspirant dans la direction opposée de la cigarette correspondant en général à l'extrémité du filtre.

L'élément filtre est entouré d'un papier qui peut ou non laisser passer l'air au moyen de perforations ; l'élément filtre est en outre ouvert à son extrémité non liée avec le bâton de tabac pour permettre le passage de l'air et de la fumée au travers. Typiquement, le filtre a une longueur qui varie de 15 mm à 35 mm, de préférence de 25 à 30 mm et une circonférence allant de 17 à 27 mm, de préférence de 22 à 25 mm. Le matériaux utilisé provient en général de matériaux fibreux tels l'acétate de cellulose, la viscosse ou des fibres de polypropylène ; des matériaux tels un gel de silice, du charbon activé, de la triacétine et/ou du polyéthylène glycol peuvent être incorporés dans le filtre.

Le filtre a pour fonction principale d'éliminer une vaste gamme de particules contenues dans la fumée. Ainsi, il est d'usage courant depuis plusieurs années d'utiliser différents systèmes de filtres dans les cigarettes et autres articles à fumer pour réduire la quantité de certains constituants toxiques de la fumée, notamment les composés ayant des effets mutagènes et cancérigènes. Ces filtres réduisent dans une certaine limite les constituants nocifs contenus dans la fumée de tabac, mais leur efficacité demeure encore insatisfaisante. Le but de la présente invention est donc de palier à cette inefficacité.

L'objet de la présente invention est donc de fournir un procédé pour réduire, dans un fluide destiné à être mis en présence d'une structure biologique comprenant au moins un acide nucléique, la concentration en molécules susceptibles de réagir avec ledit acide nucléique caractérisé en ce que, préalablement à la mise en présence

dudit fluide avec ladite structure, on met en contact ledit fluide avec un acide nucléique en quantité suffisante pour permettre la réaction desdites molécules sur ledit acide nucléique mis en contact avec ledit fluide.

5 Par structure biologique, on entend désigner une cellule vivante procaryote ou eucaryote, animale ou végétale. Parmi les cellules animales, il convient de citer les cellules de mammifères tels les bovins, les ovins, les caprins, le porc, les équidés, les rongeurs tels la souris, le rat et de préférence les cellules humaines. Les cellules humaines sont
10 de préférence les cellules impliquées dans la fonction respiratoire et celles qui sont en contact direct avec la fumée de tabac et le goudron issu de la combustion du tabac telles que les cellules du tractus respiratoire telles par exemple les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules nasales, les cellules de la trachée. Par extension, on entendra
15 par structure biologique un organisme vivant entier tel un homme ou une femme, un animal, une plante.

Le fluide selon l'invention est un fluide gazeux ou un fluide liquide. De manière préférée il s'agit d'un fluide gazeux tel que l'air ou la fumée. Lorsqu'il s'agit d'air, il s'agira d'air vicié c'est-à-dire d'air pollué
20 par des composés qui le rendent peu propres à son utilisation par une structure biologique. La fonction de respiration est un exemple d'utilisation par une structure biologique.

Par fumée on entend désigner le mélange plus ou moins dense et de couleur variable de produits gazeux et de très fines particules solides
25 qui se dégage de corps en combustion ou portés à haute température. Selon un mode de réalisation de l'invention la fumée provient de la combustion d'un article à fumer comprenant une portion de tabac comprenant au moins un produit de type tabac. Selon un mode préféré de réalisation la fumée selon l'invention est l'article à fumer est de
30 préférence une cigarette, un cigare ou une pipe. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la fumée provient de procédés industriels.

L'acide nucléique selon l'invention est composé d'au moins un nucléotide; de manière préférée, l'acide nucléique est, selon l'invention, un polynucléotide, tel que de l'ADN ou de l'ARN. L'acide nucléique selon l'invention peut être sous la forme simple brin, double brin ou sous
5 forme triplex. De manière plus préférée, l'acide nucléique selon l'invention est de l'ADN double brin.

L'acide nucléique selon l'invention peut être modifié pour favoriser sa réactivité avec les molécules susceptibles de réagir avec tout acide nucléique. Ces modifications de l'acide nucléique peuvent être
10 introduites chimiquement, physiquement ou biologiquement. Elles conduisent à des modifications intrinsèques des nucléotides, à des modifications des liaisons entre deux nucléotides, et/ou à des modifications des liaisons entre deux nucléotides situés chacun sur un brin de l'acide nucléique double brin. L'acide nucléique de l'invention
15 peut ainsi contenir des nucléotides modifiés, c'est-à-dire autres que les nucléotides dits « normaux » qui sont l'acide adénylique ou déoxydénylique, l'acide guanylique ou dioxypyguanylique, l'acide cytidylique ou déoxycytidilique, l'acide thymidilique ou déoxythymidilique, l'acide uridilique. Les nucléotides modifiés peuvent
20 être modifiés à n'importe quelle position des nucléotides. Un grand nombre de nucléotides modifiés sont utilisables pour la mise en œuvre de l'invention. Ces nucléotides modifiés sont choisis parmi les nucléotides modifiés artificiellement ou naturellement. Parmi les nucléotides modifiés naturellement, il convient de citer ceux présents
25 dans les ARN procaryotes ou eucaryotes (pour revue, voir Limbach *et al.*, 1995 ; Motorim et Grosjean, 1998).

Une séquence spécifique d'acide nucléique peut également être utilisée afin de favoriser la réactivité d'une molécule particulière avec ledit acide nucléique. Par ailleurs, la séquence de l'acide nucléique
30 selon l'invention peut être choisie de telle sorte qu'elle favorise la formation d'une structure particulière de la molécule d'acide nucléique. Ainsi, une séquence d'acide nucléique double brin possédant une

répétition de dinucléotides (TG)_n présente la propriété d'adopter une conformation particulière appelée forme Z de l'ADN, les dinucléotides (TC)_n présentent la propriété d'adopter une conformation particulière appelée forme H de l'ADN.

5 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ladite mise en contact dudit fluide avec ledit acide nucléique en quantité suffisante se fait dans un compartiment intermédiaire. Le fluide est mis en présence de ladite structure biologique après séjour dans ledit
10 compartiment intermédiaire ou après passage au travers dudit compartiment intermédiaire qui comprend une préparation contenant ledit acide nucléique.

 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ledit compartiment est constitué d'un support solide sur lequel est fixé ledit acide nucléique. Selon un mode préféré de réalisation, le support solide
15 est une membrane.

 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites molécules susceptibles de réagir avec ledit acide nucléique sont des molécules mutagènes et/ou cancérigènes.

 Par réaction avec un acide nucléique, on entend désigner toutes
20 les actions faisant intervenir les molécules selon l'invention et susceptibles d'altérer directement ou indirectement l'intégrité de l'acide nucléique. Ces actions peuvent être par exemple la création d'adduits covalents avec l'acide nucléique, la formation de coupures simple ou double brin dans l'ADN, l'intercalation de molécules entre les paires de
25 bases de l'acide nucléique, le pontage chimique intra ou intermoléculaire.

 Parmi les molécules mutagènes et/ou cancérigènes, il convient de citer les molécules préalablement citées et notamment les hydrocarbures polycycliques, les radicaux libres, les aldéhydes
30 aliphatiques saturés et insaturés, les nitrosamines, les agents intercalants, l'amiante, les acridines, les diquinolines, les imidazoles, les pyrrolizines et leurs dérivés.

L'invention porte également sur un filtre pour fluide destiné à la mise en œuvre du procédé selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend au moins un compartiment intermédiaire comprenant une préparation contenant un acide nucléique. Le filtre peut comprendre en
5 outre un élément filtrant additionnel composé de matériel fibreux ou granulaire tel par exemple l'acétate de cellulose, la viscosse, les fibres de polypropylène, le gel de silice, le charbon activé.

Selon un mode particulier de réalisation du filtre, ledit compartiment intermédiaire est placé à l'entrée et/ou en sortie dudit
10 élément filtrant additionnel.

Selon un mode préféré de réalisation, le filtre selon l'invention entre dans la composition d'un article à fumer tel que décrit ci-après. Selon un autre mode de réalisation, le filtre selon l'invention est utilisé dans l'industrie pour réduire la concentration de l'air en substances
15 susceptibles de réagir avec un acide nucléique ; de telles substances sont toxiques pour les cellules vivantes et, par extension, toxiques pour les organismes vivants, tels que l'homme, les animaux ou les plantes. Le filtre selon l'invention peut être utilisé dans l'industrie dans des systèmes de filtration de l'air. Le filtre selon l'invention peut également
20 entrer dans la composition de masques personnels protecteurs des fumées ou de gaz toxiques ou asphyxiants. Ainsi, de tels masques peuvent être utilisés par des hommes travaillant dans une atmosphère chargée en amiante, dans les usines d'incinération des ordures, dans l'industrie de la distillation destructrice du charbon et du bois, dans le
25 fumage de denrées alimentaires, ou dans des secteurs d'activités impliquant la combustion du fuel dans les moteurs diesel ou à essence.

Le procédé de l'invention s'applique donc non seulement au traitement de la fumée de tabac mais également au traitement de tous gaz contenant des composés mutagènes et cancérigènes ayant une
30 affinité pour l'ADN.

Enfin, l'invention porte sur un article à fumer pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, comprenant au moins une portion

de tabac susceptible d'être consommée en produisant une fumée et comprenant au moins un produit de type tabac et une extrémité qui ne se consume pas, caractérisé en ce qu'il comprend entre ladite portion de tabac et ladite extrémité qui ne se consume pas un filtre tel que décrit
5 précédemment. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'article à fumer se caractérise en ce que le filtre constitue l'extrémité de l'article à fumer qui ne se consume pas.

L'article à fumer selon l'invention est choisi dans le groupe composé des cigarettes, cigares, pipes, porte-cigarettes, porte-cigares et
10 de leurs équivalents. Selon un mode préféré de réalisation l'article à fumer est une cigarette.

Enfin, l'invention concerne un procédé pour réduire la concentration en molécules susceptibles de réagir avec un acide nucléique en suspension dans un fluide caractérisé en ce que le procédé comprend
15 les étapes suivantes de mise en contact dudit fluide avec un acide nucléique en quantité suffisante et de fixation desdites molécules sur ledit acide nucléique ; ledit procédé se caractérise en ce que ledit fluide pénètre dans un compartiment, est mis en contact avec ledit acide nucléique sur lequel réagissent lesdites molécules puis ressort dudit
20 compartiment en ayant réduit de manière substantielle la concentration desdites molécules dans ledit fluide.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants.

25

EXEMPLES

1. Description des cigarettes

30

Chacune des cigarettes utilisées dans les exemples ci-après a une circonférence d'environ 24.8 mm et inclut un bâton de tabac ayant une longueur de 57 mm et un élément filtrant.

- 5 Les cigarettes selon l'invention possèdent un élément filtrant contenant l'acide nucléique selon l'invention. Pour les cigarettes contrôle, des échantillons de cigarettes sont préparées sans que l'élément filtrant ne contienne l'acide nucléique selon l'invention. L'élément filtrant est composé d'acétate de cellulose et est attaché au bâton de tabac en
- 10 utilisant un papier non poreux. Les cigarettes contrôle et les cigarettes selon l'invention contiennent la même quantité d'acétate de cellulose. Les cigarettes contrôle possèdent un élément filtrant de 27mm. Les expériences sont réalisées avec des éléments filtres ventilés et non ventilés. Des cigarettes contrôle supplémentaires sont utilisées qui sont
- 15 dépourvues d'élément filtrant.

Le mélange à fumer consiste en du tabac qui a la forme de ce qui est appelé "mélange américain" et inclut les tabacs "Flue-cured", "Burky" et "Oriental" ainsi que du tabac reconstitué. Le mélange de tabac est roulé

20 avec un mélange de glycérine, d'eau et de saveurs. Le mélange est sous la forme de brins ou de lambeaux ayant une longueur moyenne de 1mm. Le mélange de tabac est équilibré à un taux d'humidité d'approximativement 12.5%. Chaque cigarette contient 650mg de tabac.

25

2. Analyses chimiques de la fumée principale de cigarette

Une machine à fumer utilisant un procédé standard international (FTC)

30 est utilisée pour générer la fumée principale de cigarette pour les analyses chimiques (Volume d'aspiration 35 ml, durée 2 secondes, une aspiration par minute). La méthode FTC est utilisée pour déterminer la

quantité totale de matière particulaire, de la nicotine et du goudron (Pillsbury *et al.*, 1969).

Les analyses suivantes sont réalisées sur la fumée principale qui traverse le filtre et/ou est inhalée par le fumeur. Le monoxyde de carbone est déterminé par spectroscopie infra-rouge non dispersive après récupération de la phase gazeuse. L'ammoniac est déterminé par un procédé colorimétrique (Harell *et al.* 1975). L'acrylonitrile, le benzène, l'isoprène, le 1.3-butadiène sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse avec une détection sélective de la masse selon des conditions adaptées du protocole publié par Byrd *et al.* (1990). Le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone et l'acroléine sont déterminés par chromatographie liquide avec une détection de fluorescence après modification avec le 2-diphényl-acétyl-1,3 indandione-1-hydrazone pour former des dérivés azymes (Borgerding *et al.*, 1984). Les oxydes d'azote sont déterminés par chimiluminescence (Neurath *et al.*, 1976). Le cyanide d'hydrogène est déterminé selon la méthode de Collins *et al.* (1970).

20.

3. Préparation des condensés de fumée de cigarette (CFC)

Des condensés de fumée de cigarette provenant de 6 cigarettes identiques sont préparés en fumant les cigarettes dans une machine à fumer selon les conditions FTC (volume d'aspiration 35 ml, durée 2 secondes, une aspiration par minute).

Les condensés de fumée de cigarette (CFC) sont collectés sur un filtre Cambridge et pesés. Les filtres sont extraits avec du DMSO, dont le volume est adapté à la masse de matériel sur le filtre Cambridge (Pillsbury *et al.* 1969). Le DMSO est utilisé comme solvant contrôle pour tous les tests utilisant des CFC.

4. Technologie d'exposition de cellules à la fumée (TECF)

- 5 La technologie TEFC est décrite dans Bombick *et al.* (1997). Brièvement, la fumée principale de cigarette est générée en fumant 6 cigarettes selon les conditions FTC sur un carrousel en rotation tel que décrit par Baumgartner et Coggins (1980). La fumée principale produite par la machine à fumer est diluée dans de l'air HEPA (high efficiency particulate accumulation) filtré, humidifié et distribué dans des
- 10 chambres d'exposition de la fumée aux cellules. La concentration de la fumée dans les chambres est contrôlée par le système décrit par Ayres *et al.* (1990).
- 15 Les flasques de cellules en culture sont disposées sur des blocs d'aluminium chauffant sur une plate-forme en rotation. La température des flasques est maintenue à 37°C. Les flasques de culture sont individuellement connectées à une chambre d'exposition par un tuyau en silicone de qualité alimentaire et les cellules à l'intérieur des flasques
- 20 sont exposées à la fumée principale de cigarette qui circule à travers les flasques à un débit de 250 ml/min. La plate-forme de rotation permet aux cellules d'osciller entre une exposition au courant de fumée principale de cigarette et au milieu de culture à une vitesse de 7 cycles/min en moyenne.

25

5. Test Ames de mutagénicité bactérienne

- La mutagénicité a été évaluée avec le test Salmonelle (*Salmonella typhimurium*) (Ames *et al.*, 1975 ; Maron et Ames, 1983) avec une étape
- 30 de pré-incubation modifiée selon Yahagi *et al.* (1975). Les tests sont conduits avec ou sans le système d'activation métabolique (mélange S9). Le surnageant post-mitochondrial S9 (9000 X g) est préparé à partir de

foie de rat mâle Sprague-Dawley Aroclor 1254 induit (Ames *et al.* 1975). La concentration finale de mélange S9 dans le système métabolique est de 10% (v/v). Chaque échantillon est testé à quatre doses différentes. Tous les tests sont réalisés en double. Toutes les expériences sont
5 réalisées sur 3 boîtes pour chaque concentration. Le DMSO est utilisé comme solvant contrôle négatif. Les contrôles positifs utilisant le 2 Amino-fluorène et un condensé de fumée de cigarette sans filtre sont réalisés simultanément avec toutes les expériences.

- 10 Les échantillons test de condensé de fumée de cigarettes (CFC) dans du DMSO (qui ne doivent pas excéder 50 µl par boîte) sont ajoutés au mélange S9 contenant la bactérie test dans un tube à essai en verre maintenu à 37°C avant l'addition de 2 ml de TOP Agar fondu. Le contenu des tubes est versé sur un milieu Agar glucose minimal et
15 incubé à 37°C pendant 48 heures.

Un échantillon est considéré comme mutagène si il induit une augmentation du nombre des révertants avec une quantité au moins double de révertants dans l'échantillon testé que dans l'échantillon
20 contrôle.

Les courbes sont réalisées à partir des lignes de régression linéaire construites à partir du Log de la concentration par rapport au nombre des révertants. Les nombres qui expriment l'activité Ames représentent
25 la pente exprimée comme le nombre de révertant par milligramme de condensé de fumée de cigarettes.

6. Test d'échange de chromatides sœurs (SCE) sur des cellules 30 exposées au CFC

Environ un million de cellules (CHO) sont ensemencées dans des flasques T75 dans 10ml de milieu complet Mc Coy's 5a et cultivées pendant environ 24 heures avant le traitement.

- 5 Les tests de SCE sans activation métabolique ont été réalisés de la manière suivante : des cultures cellulaires contenant des concentrations différentes de CFC dilué dans le milieu de culture (0, 10, 25, 50, 75 et 100 $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture) sont réalisées pendant 2.4 heures. Du 5-Bromo-2-déoxyuridine (BrdU) est ensuite ajouté au milieu
10 à une concentration finale de 10 μM . Les cultures sont incubées à nouveau pendant 22.6 heures.

- Les cultures cellulaires sont rincées pour éliminer les CFC et un nouveau milieu contenant du BrdU et de la colcemide (0,1 $\mu\text{g/ml}$) est
15 ajouté. Les cultures sont récoltées 2.5 heures plus tard.

Des lames sont préparées et colorées avec la technique FPG (Fluorescence Plus-Giemsa).

20

7. Test d'échange de chromatides sœur (SCE) sur des cellules exposées à la fumée

- Les cellules CHO sont ensemencées dans des flasques T75 à une
25 densité de 1.2 million de cellules dans 20 ml de milieu Ham's F12 avec de l'Hepes 25 mM et 10% de sérum de veau fœtal, et incubées pendant 18 à 24 heures. Juste avant l'exposition à la fumée, du BrdU (10 μM) est ajouté à chaque flasque. Des flasques en trois exemplaires sont exposées à chaque concentration de fumée totale pendant une heure.
30 Des flasques contrôle en trois exemplaires sont exposées à de l'air HEPA filtré humidifié. Après une heure d'exposition, les cellules sont incubées à nouveau dans un incubateur pendant au moins 27,5 heures avec du

colcemide pendant les dernières 2,5 heures. Les cellules sont récoltées et fixées, et au moins trois lames sont préparées pour chaque flasque. Des lames sont préparées et colorées avec la technique FPG.

5 8. Test de cytotoxicité au rouge neutre

Les cellules CHO sontensemencées dans une microplaque à 96 puits à une densité de 10 000 cellules par puits, puis incubées à 37°C dans une atmosphère humide air/CO₂ 5%.

10

Après 24 heures, le milieu de culture contenu dans chaque puits est aspiré et les cellules sont exposées à différentes concentrations de CFC (condensé de fumée de cigarettes) dissous dans du DMSO. Du milieu Ham's F-12 est ajouté à raison de 200 µl par puits.

15

Après la période d'exposition de 1 heure à 37°C, le milieu est aspiré de chaque puits, puis remplacé par 200 µl d'une solution de rouge neutre (colorant vital). Après 1 heure d'incubation à 37°C, les puits sont vidés et lavés avec 100 µl de PBS/Formol 1% PH 6.5. L'élution est effectuée avec 100 µl de tampon citrate 0.1N pH4.2/éthanol par puits pendant 15 minutes. Les microplaques sont introduites dans un spectrophotomètre et la densité optique (DO) est lue à 550nm.

20

Un témoin négatif (DMSO) est intégré dans chaque plaque.

25

Un échantillon test de CFC est considéré comme cytotoxique s'il induit, à une concentration donnée, une diminution de 50% d'incorporation du rouge neutre (dose cytotoxique 50% ou EC50). Les valeurs EC50 des différents échantillons testés sont comparées.

REFERENCES

- Ayres P.H. *et al.* (1990) *Am. Coll. Toxicol.* 9 : 441-446 ;
5
Baumgartner H. et Coggins C.R.E. (1980) *Beitn. Talakforsch. Int.* 10 :
169-174 ;
- Bombick D.W *et al.* (1997), *Fund. App. Toxicology* 39 : 11-17 ;
10
Borgerding M.F. *et al.* (1984), 38TH Tobacco Chemists Research
conference, Atlanta GA, Abstract 50 ;
- Byrd G.D. *et al.*, (1990) *J. Chromalog.* 503 : 359-368 ;
15
Collins P.F. *et al.* (1970) *Tol. Sa.* 14 :12-15 ;
- Harrel T.G. *et al.* (1975) *Job Sci.* 19 : 145-147 ;
- 20 Hecht S.S. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.* 91 : 1194-1210 ;
Hecht S.S. (1999) *Mutat. Res.* 424 :127-142 ;
- Izzoti *et al.* (1999) *Carcinogenesis* 20 :1499-1506 ;
25
Limbach P.A. *et al.* (1995) *Biochimie* 77 : 135-138 ;
- Maron D.M. and Ames B.N. (1983) *Mut. Res.* 113, 173-215 ;
- 30 Meehan *et al.* (1999) *Environ. Mol. Mutagen* 33 : 273-278 ;

Motorim et Grosjean (1998) appendix 1 : chemical structures and classification of posttranscriptionally modified nucleosides in RNA. Modification and Editing of RNA. 543-549 ;

- 5 Neurath GB *et al.* (1976), IARC Scientific Publication N°14 Environmental N-nitroso compounds analysis and formation ; EA Walker, P. Bogowski and L. Gricinte Editions pp 215-225 ;

Pillsbury H.C. *et al.* (1969), J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52 : 458-462 ;

10

Pryor *et al.* (1998) Chem. Res. Toxicol. 11 : 441-448 ;

Pyysalo H.J. *et al.* (1987) Atmosph. Environ. 21 : 1167-1180 ;

- 15 Shoyab (1979) Arch. Biochem. Biophys. 196 :307 ;

Stone *et al.* (1994) Environ. Health Perspect. 102 : 173-178 ;

Welch *et al.* (1977) Clin. Pharmacol. Ther. 22 : 791 ;

20

Yahagi T. *et al.* (1975) Cancer Lett.1 : 91-97 ;

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé pour réduire, dans un fluide destiné à être mis en présence d'une structure biologique comprenant au moins un acide nucléique, la concentration en molécules susceptibles de réagir avec ledit acide nucléique caractérisé en ce que, préalablement à la mise en présence dudit fluide avec ladite structure, on met en contact ledit fluide avec
10 un acide nucléique en quantité suffisante pour permettre la réaction desdites molécules sur ledit acide nucléique mis en contact avec ledit fluide.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit acide nucléique est de l'ADN.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit acide nucléique mis en contact avec ledit fluide est de l'ADN double brin.
- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que ladite mise en contact dudit fluide avec ledit acide nucléique en quantité suffisante se fait dans un compartiment intermédiaire.
- 25 5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit fluide est mis en présence de ladite structure biologique après séjour dans ledit compartiment intermédiaire ou après passage au travers dudit compartiment intermédiaire.
- 30 6. Procédé selon les revendications 4 et 5 caractérisé en ce que ledit compartiment comprend une préparation contenant ledit acide nucléique.

7. Procédé selon les revendications 4 à 6 caractérisé en ce que ledit compartiment est constitué d'un support solide sur lequel est fixé ledit acide nucléique.
- 5 8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que ledit support solide est une membrane.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 et 8 caractérisé en ce que ledit fluide est un fluide gazeux ou un fluide liquide.
- 10 10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit fluide gazeux est de l'air ou de la fumée.
11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la fumée provient de la combustion d'un article à fumer comprenant une portion tabac comprenant au moins un produit de type tabac.
- 15 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que lesdites molécules susceptibles de réagir avec ledit acide nucléique sont des molécules mutagènes et/ou cancérogènes.
- 20 13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que la réaction desdites molécules sur ledit acide nucléique se fait par création d'adduits covalents.
- 25 14. Procédé selon les revendications 12 et 13 caractérisé en ce que lesdites molécules sont des hydrocarbures polycycliques, les radicaux libres, des aldéhydes aliphatiques saturés et insaturés, les nitrosamines, les agents intercalants, de l'amiante, des acridines, des diquinolines, des imidazoles, des pyrrolizines ou leurs dérivés.
- 30

15. Filtre pour fluide destiné à la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un compartiment intermédiaire comprenant une préparation contenant un acide nucléique.
- 5
16. Filtre selon la revendication 15 caractérisé en ce que ledit filtre comprend en outre un élément filtrant additionnel composé de matériel fibreux ou granulaire.
- 10 17. Filtre selon la revendication 16 caractérisé en ce que ledit compartiment intermédiaire est placé à l'entrée et/ou en sortie dudit élément filtrant additionnel.
- 15 18. Article à fumer pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, comprenant au moins une portion de tabac susceptible d'être consommée en produisant une fumée et comprenant au moins un produit de type tabac et une extrémité qui ne se consume pas, caractérisé en ce qu'il comprend entre ladite portion de tabac et ladite extrémité qui ne se consume
- 20 pas un filtre selon les revendications 15 à 17.
19. Article à fumer selon la revendication 18 caractérisé en ce que ledit filtre constitue l'extrémité de l'article à fumer qui ne se consume pas.
- 25
20. Article à fumer selon l'une quelconque des revendications 18 et 19 caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe composé de cigarette, du cigare, de la pipe et de leurs équivalents.
- 30 21. Article à fumer selon la revendication 20 caractérisé en ce que l'article à fumer est une cigarette.

22. Procédé pour réduire la concentration en molécules susceptibles de réagir avec un acide nucléique en suspension dans un fluide caractérisé en ce que le procédé comprend les étapes suivantes :
- a) mise en contact dudit fluide avec un acide nucléique en
5 quantité suffisante;
 - b) fixation desdites molécules sur ledit acide nucléique.
23. Procédé selon la revendication 22 caractérisé en ce que ledit fluide pénètre dans un compartiment, est mis en contact avec ledit acide
10 nucléique sur lequel réagissent lesdites molécules puis ressort dudit compartiment en ayant réduit de manière substantielle la concentration desdites molécules dans ledit fluide.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2800299

N° d'enregistrement
nationalFA 579633
FR 9913540

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 01, 31 janvier 1996 (1996-01-31) & JP 07 241570 A (YUKI GOSEI KOGYO CO LTD), 19 septembre 1995 (1995-09-19) * abrégé *	1,2,9, 12,14,22	B01J20/24 B01D39/14 B01D53/72 A24D3/14 A24D1/04 A24F1/02 C07H21/00 B01D113/00 B01D157/00
X	GB 2 155 756 A (PIP-FUJIMOTO CO.) 2 octobre 1985 (1985-10-02) * page 2, ligne 9 - ligne 14 * * page 2, ligne 29 - ligne 34 *	1-23	
X	EP 0 058 463 A (GIST-BROCADES) 25 août 1982 (1982-08-25) * page 3, ligne 17 - ligne 22; revendications 1,9 *	1-6,9-23	
X	US 4 735 218 A (K. AKIKO) 5 avril 1988 (1988-04-05) * colonne 1, ligne 61 - ligne 64 *	1-6,9-23	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)
			B01J A24D B01D
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 juillet 2000		Hilgenga, K	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : antère-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire & : membre de la même famille, document correspondant			

DERWENT-ACC-NO: 2001-391933

DERWENT-WEEK: 200142

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Removing nucleic acid-binding contaminants
from fluids,
comprises for use particularly as cigarette filters,
contacting smoke with nucleic acid before it is
inhaled

INVENTOR: THARAUD, C; VASSEUR, M

PATENT-ASSIGNEE: GENSET SA[GEST]

PRIORITY-DATA: 1999FR-0013540 (October 28, 1999)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES MAIN-IPC		
FR 2800299 A1	May 4, 2001	N/A
023 B01J 020/24		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
FR 2800299A1	N/A	1999FR-0013540
October 28, 1999		

INT-CL (IPC): A24D001/04, A24D003/14, A24F001/02, B01D039/14,
B01D053/72, B01D113:00, B01D157:00, B01J020/24, C07H021/00

ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2800299A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Reducing, in a fluid that will come into contact with a
biological
structure that contains at least one nucleic acid, the concentration
of
molecules (I) that react with nucleic acid, comprising before contact
with the
biological system, contacting the fluid with sufficient nucleic acid
to react
with (I).

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) a filter for the process that includes an intermediate compartment containing nucleic acid; and

(2) a smoking article that includes a filter of (1).

USE - The method is especially used to remove carcinogens and mitogens from tobacco smoke, but can be applied more generally, e.g., when incorporated into a face mask, to treat air for removal of asbestos or smoke from fires or industrial operations.

ADVANTAGE - The method provides more effective removal of harmful chemicals from smoke than conventional cigarette filters.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: REMOVE NUCLEIC ACID BIND CONTAMINATE FLUID CIGARETTE FILTER

COMPRISE CONTACT SMOKE NUCLEIC ACID INHALE

DERWENT-CLASS: D16 E19 J01 P15

CPI-CODES: D05-H; D05-H13; E06-H; E07-H03; E07-H04; E10-A01; E10-A03;

E10-D01D; E10-J02B4; E11-Q02; E31-P04; J01-E02; J01-G03;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M3 *01*

Fragmentation Code

A212 A220 A940 B114 B701 B712 B720 B831 C101 C108

C550 C802 C804 C805 C807 M411 M750 M904 M905 Q243

Q431 Q436 Q439

Specific Compounds

16211K 16211X

Chemical Indexing M3 *02*

Fragmentation Code

G000 G450 M280 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M610

M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Ring Index

06399

Specific Compounds

A0FNJK A0FNJX

Chemical Indexing M3 *03*

Fragmentation Code

G000 G470 M280 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M610
M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Ring Index

07029

Specific Compounds

A4G1IK A4G1IX

Chemical Indexing M3 *04*

Fragmentation Code

G000 G430 M280 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M610
M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Ring Index

05255

Specific Compounds

A4G1JK A4G1JX

Chemical Indexing M3 *05*

Fragmentation Code

C107 C108 C307 C520 C730 C800 C801 C802 C803 C804
C807 M411 M750 M904 M905 M910 Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds

01881K 01881X

Registry Numbers

1881U

Chemical Indexing M3 *06*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J4 J471 M210 M212 M262 M281 M320
M416 M750 M904 M905 M910 Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds

00808K 00808X

Registry Numbers

0808U

Chemical Indexing M3 *07*

Fragmentation Code

J4 J471 M280 M320 M416 M620 M750 M904 M905 M910
Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds

00001K 00001X

Registry Numbers

0001U

Chemical Indexing M3 *08*

Fragmentation Code

J4 J471 M210 M211 M262 M281 M320 M416 M620 M750
M904 M905 M910 Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds
00343K 00343X
Registry Numbers
0343U

Chemical Indexing M3 *09*

Fragmentation Code

C107 F013 F431 J5 J581 K0 K6 K610 K7 K751
M210 M211 M273 M281 M313 M321 M332 M342 M381 M391
M413 M510 M521 M530 M540 M750 M904 M905 Q243 Q431
Q436 Q439

Specific Compounds
A4G1SK A4G1SX

Chemical Indexing M3 *10*

Fragmentation Code

C107 F013 F431 H4 H401 H481 H8 K0 K6 K610
K7 K751 M210 M211 M273 M281 M314 M321 M332 M343
M373 M391 M413 M510 M521 M530 M540 M750 M904 M905
Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds
A4G1YK A4G1YX

Chemical Indexing M3 *11*

Fragmentation Code

C107 F011 F012 F013 F423 F431 H2 H211 K0 K6
K610 K7 K751 M1 M116 M280 M320 M413 M510 M522
M530 M540 M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Specific Compounds
A4G24K A4G24X

Chemical Indexing M3 *12*

Fragmentation Code

G000 G040 G221 M280 M320 M414 M510 M520 M531 M540
M610 M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Markush Compounds
200042-24401-K 200042-24401-X

Chemical Indexing M3 *13*

Fragmentation Code

H714 H721 J4 J471 M210 M211 M212 M213 M214 M215
M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232
M233 M262 M281 M320 M416 M620 M750 M904 M905 Q243
Q431 Q436 Q439

Markush Compounds
200042-24402-K 200042-24402-X

Chemical Indexing M3 *14*

Fragmentation Code

D000 D011 D021 D022 D023 D024 D025 D029 E111 M280

M320 M412 M511 M520 M530 M540 M750 M904 M905 Q243
Q431 Q436 Q439
Markush Compounds
200042-24403-K 200042-24403-X

Chemical Indexing M3 *15*

Fragmentation Code

D012 D013 D014 D019 D021 D022 D023 D024 D025 D029
D621 D699 M1 M116 M280 M320 M412 M512 M520 M530
M540 M750 M904 M905 Q243 Q431 Q436 Q439

Markush Compounds

200042-24404-K 200042-24404-X

Chemical Indexing M3 *16*

Fragmentation Code

F000 F011 F012 F014 F015 F521 H181 H201 M280 M320
M413 M510 M521 M530 M540 M750 M904 M905 Q243 Q431
Q436 Q439

Markush Compounds

200042-24405-K 200042-24405-X

Chemical Indexing M3 *17*

Fragmentation Code

D000 D011 D012 D013 D014 D016 D019 D690 M280 M320
M412 M511 M520 M530 M540 M750 M904 M905 Q243 Q431
Q436 Q439

Ring Index

00976

Markush Compounds

200042-24406-K 200042-24406-X

Chemical Indexing M3 *18*

Fragmentation Code

M781 M905 Q243 Q431 Q436 Q439 Q508 R032 R042

Specific Compounds

A00NSK A00NSR

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0001U; 0343U ; 0808U ; 1881U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C2001-119488

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N2001-288383